(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0075406
(43) 공개일자 2021년06월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01) *C07K 7/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 1/0226 (2013.01)
C07K 7/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0166411
(22) 출원일자 2019년12월13일
심사청구일자 2019년12월13일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
임동권
서울특별시 강남구 언주로 203(도곡동, 매봉삼성아파트) 101동 2004호
안동준
서울특별시 서초구 사임당로19길 10, 102동 802호(서초동, 서초현대아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리채

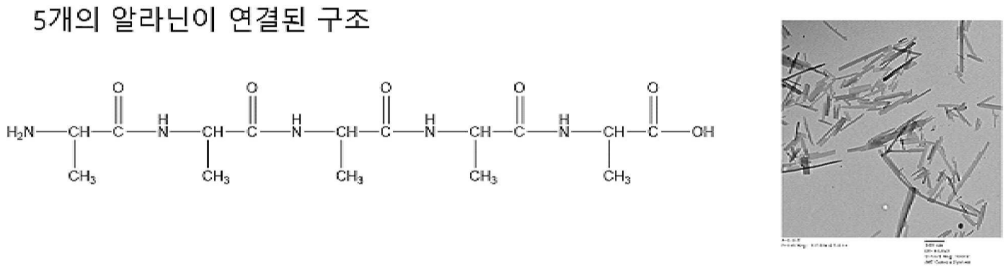
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **올리고펩티드 자기조립 나노 구조체를 포함하는 결빙 제어용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 부동단백질에서 중요한 역할을 하는 아미노산만으로 구성된 올리고펩티드가 수용액에서 자기조립 과정을 통해 나노 및 마이크로로 크기로 형성된 물질, 방법에 관한한것미며, 올리고펩티드로 구성된 자기조립 물질은 독성이 없고, 또한 세포 및 조직의 보호 효과가 우수하면서도 저비용으로 생산이 가능한 동결 보존제로 의학, 식품분야등의 다양한 관련 산업에서 활용 가능성이 매우 높다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이예담

서울특별시 은평구 증산로1길 26, 102동 803호(수색동, DMC청구아파트)

김용덕

서울특별시 광진구 동일로68길 41(중곡동), 302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2017M3D1A1039421
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	미래소재디스커버리사업
연구과제명	DNA 기반 결빙제어소재 개발 및 평가
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교 산학협력단
연구기간	2017.09.01 ~ 2023.08.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

$(X)_n$으로 표시되는 올리고펩티드를 포함하는, 세포 및 조직의 동결보존용 조성물:

상기 X는 Ser, Asp, Glu, Cys, Ala, Val, Tyr, 및 Thr으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산이고,

상기 n은 1 내지 15의 정수이다.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 X는 Ala, Val, Tyr, 및 Thr로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인, 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 n은 5 내지 10의 정수인, 조성물.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 세포는 원핵 세포, 진핵 세포, 미생물, 동물 세포, 암 세포, 정자, 난자, 성체 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 역분화 줄기 세포, 제대혈, 백혈구, 적혈구, 혈소판, 신장 세포, 간 세포, 또는 근육 세포인, 조성물.

청구항 5

$(X)_n$으로 표시되는 올리고펩티드를 포함하는, 결빙 제어용 조성물:

상기 X는 Ser, Asp, Glu, Cys, Ala, Val, Tyr, 및 Thr으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산이고,

상기 n은 1 내지 15의 정수이다.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 X는 Ala, Val, Tyr, 및 Thr로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인, 조성물.

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 n은 5 내지 10의 정수인, 조성물.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 얼음의 재결정화를 억제하거나, 물의 어는점을 낮추거나, 얼음의 재결정화를 억제하고 물의 어는점을 낮추는, 조성물.

청구항 9

$(X)_n$으로 표시되는 올리고펩티드를 포함하는, 식품의 동결보존용 조성물:

상기 X는 Ser, Asp, Glu, Cys, Ala, Val, Tyr, 및 Thr으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산이고,

상기 n은 1 내지 15의 정수이다.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 X는 Ala, Val, Tyr, 및 Thr로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인, 조성물.

청구항 11

청구항 9에 있어서, 상기 n은 5 내지 10의 정수인, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 결빙제어 특성을 나타내는 올리고펩티드 자기조립 나노 구조체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 식물이나 동물의 세포, 조직, 또는 식품 등의 물을 포함하는 물질을 장기 보존하기 위해 0℃ 이하의 온도에서의 동결 보존법이 일상적으로 사용되고 있다. 그러나, 이들 물을 함유하는 물질을 동결하면, 동결 중에 물 분자끼리 용질이나 혼입물의 매질을 배제(排除)하면서 결정화하여 물 분자만으로 이루어진 얼음 결정을 형성하므로, 함수물 중에서 용질이나 혼입물의 매질이 불균일하게 확산되어, 동결 농축이 발생하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 동결 농축을 방지하기 위해, 여러 가지 저분자 화합물을 첨가하는 방법이 실시되고 있다. 예를들어, 세포의 동결 보존을 실시하는 경우에 동결 보존 중에 일어나는 세포내의 물의 결정화에 의한 세포 손상을 최소화하기 위해 동결 보호제로서 디메틸설폭시드(DMSO)나 글리세롤 등을 첨가하는 방법이 널리 활용되고 있다.

[0004] 즉, 5~20 %의 디메틸설폭시드, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등의 동결 보존제를 포함하는 배양액등의 생리적 용액에 세포를 현탁하여 크라이오 튜브에 채워 냉각하고, 최종적으로 -80 ℃ 또는 -196 ℃의 극저온에서 동결 보존하는 것이 일반적이다.

[0005] 그 중에서도 가장 효과가 높고, 자주 사용되고 있는 것이 디메틸설폭시드이다. 그러나 디메틸설폭시드가 특히 높은 농도에서는 생리학적으로 유독하고, 동결 보존된 세포를 주입받은 환자에게 고혈압, 오심(惡心), 구토를일으키는 것도 알려져 있다. 디메틸설폭시드의 독성에 의해 해동한 세포의 배양시 또는 생체에 주입한 후의 생존율이나 기능이 저하되는 문제도 있다. 또한, 글리세린 등의 다른 동결 보존제는 효과가 낮으므로, 세포를 현탁하고 얼마동안 실온 또는 냉장에서 방치하고 나서 동결할 필요가 있고, 프로그램 프리저 등에 의한 엄밀한 온도관리가 필요하다. 또한, 동결 보호 효과가 낮고, 해동후의 기능이 저하되는 등의 문제가 있다.

[0006] 한편, ES 세포나 iPS 세포 등의 간세포나 정자, 난자, 수정란 등에서는 예를 들어 디메틸설폭시드, 아세트아미드, 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜 등의 고농도의 동해(凍害) 보호 물질을 함유하는 급속동결법(유리화법)이 알려져 있다. 유리화법이라는 것은 급격하게 저온으로 함으로써 세포에 포함되는 수분을 유리 형상으로 하고, 빙정(氷晶) 형성에 의한 장해를 피하는 방법이다. 그러나, 이때 사용되는 고농도의 동해 방지제의 독성이 높으므로, 세포나 조직을 손상시킬 가능성이 높아 조직의 동결 보호에는 한정적으로 밖에 사용되고 있지 않다. 한편, 의약품이나 식품, 디스플레이용 얼음을 제조하는 경우에, 염화나트륨 등의 염류나, 글루코오스, 트레할로오스 등의 당류를 첨가하는 것도 실시되고 있다.

[0007] 또한, 식물이나 어류, 곤충 등이 생산하는 부동 단백질이나 부동 당단백질의 첨가가 알려져 있다. 극지 생물체들은 극한 환경에서 생명을 유지하기 위하여 결방방지 단백질을 생체내에서 발현되어 극한 환경에서 살아가고 있다. 결빙방지 단백질 (Antifreeze protein, AFP)이란 어류, 식물, 곰팡이, 세균 등이 생산, 분비하는 단백질로 영하의 초저온 환경에서도 이들을 살아남게 해주는 특징을 가진 일군의 단백질을 통칭한다 (DeVries, 1983; D'Amico et al., 2006). 이 단백질은 세포에게 치명적인 얼음 결정의 성장을 저해하고 또 재결정화 되는 것을 막아줌으로써 영하의 온도에서도 생명체들이 얼지 않고 살아갈 수 있게 해준다.

[0008] 극지어류에서 발견된 결빙방지단백질들이 일반적으로 약 1도 정도의 TH 활성을 가지는 것에 비해 곤충에서 발견된 결빙방지단백질들은 상대적으로 더 높은 (약 4-7도) TH 활성을 가진다. 곤충에서 발견되는 결빙방지 단백질들은 Beta-helical 구조로 되어 있으며, 얼음결합 부위가 편편하고 반복적인 얼음결합 기능기 (T-X-T motif)를 가진다. 최근에 longhorn beetles 곤충 두 종 (Rhagium inquisitor 와 Rhagium mordax)에서 발견된 결빙방지단백질들은 지금까지 알려진 결빙방지단백질들 중에 가장 높은 TH 활성을 갖는 것으로 알려졌다. 이들은 특이하게도 기존에 알려진 결빙방지단백질들에 비해 길고 반복적인 얼음결합 작용기 (TxTxTxT)를 가지고 있는 것으로 나타났다.

[0009] 결빙제어 소재의 활성은 열적이력활성 (TH; Thermal hysteresis)과 얼음재결정화 억제 활성 (RI; Recrystallization inhibition)을 함께 측정하여 판단할 수 있다. 열적이력활성은 결빙방지 활성을 측정하는 하나의 지표로 녹는점과 어는점의 차이로 표시되며, Nanoliter osmometer 기기를 사용해서 측정이 가능하다. 열적이력활성 (TH) 온도 구간에서는 얼음결정이 더 이상 성장하지 못한다. 얼음재결정화 억제 활성 (RI)은 냉동에 의하여 형성된 작은 얼음 결정이 해동 후 다시 더 큰 얼음 결정으로 성장하는 것을 방지하는 작용으로써, 결빙제어 물질이 존재하는 환경에서는 냉동에 의해 형성된 작은 얼음 결정에 결빙제어 물질이 결합하여 해동과정 중에 얼음결정의 성장을 방해하게 된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 일본 공표특허공보 평10-511402호

(특허문헌 0002) 일본 특허 제3694730호

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Lovelock JE and Bishop MWH, Nature 183:1394-1395, 1959

(비특허문헌 0002) Polge C, Smith AU, Parkes AS, Nature 164:666-666, 1949

(비특허문헌 0003) Miszta-Lane H, Gill P, Mirbolooki M, Lakey JRT. Cell Preserv Technol 5, 16-24,

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 급속 냉동법을 포함하는 현상태의 동결 보존법에서는 동결 해동 후의 세포·조직의 완전한 형태에서의 보존이 곤란하고, 독성이 낮은 새로운 동결 보존 물질이 요망되고 있다. 또한, N,N-디메틸설폭시드(DMSO)는 화학물질로서 잠재적으로 독성이 있기때문에, 특정세포의 분화를 유도하는 경우도 있으며, 동결보존에 적합하지 않은 세포도 있다. 한편, 부동 단백질이나 부동 당단백질은 세포 동결 보존효과는 DMSO보다는 효과가 낮은 수준이지만, 독성이 없는 장점이 있다. 그러나 제조비용이 높기 때문에, 다양한 산업분야 (식품, 제약등)에 적용하는 데에는 한계가 있다.

[0014] 따라서 본 발명은 부동단백질에서 중요한 역할을 하는 아미노산으로 구성된 올리고펩티드의 자기조립 과정을 통해 형성된 물질에 대한 것이며, 올리고펩티드로 구성된 자기조립 물질은 독성이 없고, 또한 세포 및 조직의 보호 효과가 우수하면서도 저비용으로 생산이 가능한 동결 보존제를 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0016] 1. $(X)_n$으로 표시되는 올리고펩티드를 포함하는, 세포 및 조직의 동결보존용 조성물:

[0017] 상기 X는 Ser, Asp, Glu, Cys, Ala, Val, Tyr, 및 Thr으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산이고,

[0018] 상기 n은 1 내지 15의 정수이다.

[0019] 2. 항목 1에 있어서, 상기 X는 Ala, Val, Tyr, 및 Thr로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인, 조성물.

[0020] 3. 항목 1에 있어서, 상기 n은 5 내지 10의 정수인, 조성물.

[0021] 4. 항목 1에 있어서, 상기 세포는 원핵 세포, 진핵 세포, 미생물, 동물 세포, 암 세포, 정자, 난자, 성체 줄기

세포, 배아 줄기 세포, 역분화 줄기 세포, 제대혈, 백혈구, 적혈구, 혈소판, 신장 세포, 간 세포, 또는 근육 세포인, 조성물.

[0022] 5. $(X)_n$으로 표시되는 올리고펩티드를 포함하는, 결빙 제어용 조성물:

[0023] 상기 X는 Ser, Asp, Glu, Cys, Ala, Val, Tyr, 및 Thr으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산이고,

[0024] 상기 n은 1 내지 15의 정수이다.

[0025] 6. 항목 5에 있어서, 상기 X는 Ala, Val, Tyr, 및 Thr로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인, 조성물.

[0026] 7. 항목 5에 있어서, 상기 n은 5 내지 10의 정수인, 조성물.

[0027] 8. 항목 5에 있어서, 얼음의 재결정화를 억제하거나, 물의 어는점을 낮추거나, 얼음의 재결정화를 억제하고 물의 어는점을 낮추는, 조성물.

[0028] 9. $(X)_n$으로 표시되는 올리고펩티드를 포함하는, 식품의 동결보존용 조성물:

[0029] 상기 X는 Ser, Asp, Glu, Cys, Ala, Val, Tyr, 및 Thr으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산이고,

[0030] 상기 n은 1 내지 15의 정수이다.

[0031] 10. 항목 9에 있어서, 상기 X는 Ala, Val, Tyr, 및 Thr로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나인, 조성물.

[0032] 11. 항목 9에 있어서, 상기 n은 5 내지 10의 정수인, 조성물.

발명의 효과

[0034] 본 발명에 따른 올리고펩티드는 결빙제어 단백질에서 얼음과 상호작용을 하는 아미노산들로 구성된 짧은 펩티드로서 별도의 소수성 치환기의 도입이 없이 그 자체로 자기조립과정을 거쳐 나노 스케일의 구조를 형성하는 것으로써 기존에 알려진 결빙제어 단백질 보다 열적이력활성, 얼음재결정화 억제 활성이 높으면서도 제조비용이 매우 저렴한 장점을 가지고 있다. 세포 동결보존 효과도 DMSO와 동등한 수준이기 때문에 세포 및 조직의 동결 보존을 위한 소재로 활용 가능성이 매우 높다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 동결보존 효과를 나타내는 알라닌 5개가 연결된 올리고펩티드의 구조와 자기조립을 통해 형성된 물질의 전자현미경 사진이다.

도 2은 본 발명의 일 실시예에 따른 동결보존 효과를 나타내는 발닌 5개가 연결된 올리고펩티드의 구조와 자기조립을 통해 형성된 물질의 전자현미경 사진이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 동결보존 효과를 나타내는 타이로신 5개가 연결된 올리고펩티드의 구조와 자기조립을 통해 형성된 물질의 전자현미경 사진이다.

도 4은 본 발명의 일 실시예에 따른 동결보존 효과를 나타내는 쓰레오닌 5개가 연결된 올리고펩티드의 구조와 자기조립을 통해 형성된 물질의 전자현미경 사진이다.

도 5은 본 발명의 일 실시예에 따른 자기조립 올리고펩티드 4종의 얼음결정 성장 저해 활성과 관련한 실험 결과이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 해당 아미노산이 5개 연속으로 연결되어 만들어진 올리고펩티드 4종의 세포 동결보존효과를 DMSO와 비교 실험한 결과이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 해당 아미노산이 10개 연속으로 연결되어 만들어진 올리고펩티드 4종의 세포 동결보존효과를 DMSO와 비교 실험한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이제 본 발명은 첨부된 도면을 참조로 하기에서 더욱 충분히 기술될 것이다. 그러나 본 발명의 전부가 아닌 단지 일부의 구체예가 예시된다. 실제로, 이들 발명은 많은 다양한 형태로 구체화될 수 있으며, 본원에 제시된 구체예로 제한되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 명세서 및 첨부된 청구범위에 사용되는 단수 형태는 달리 명확하게 지시하지 않는 한 복수한 대상을 포함한다.

[0038] 식물이나 동물의 세포, 조직, 또는 식품 등의 물을 포함하는 물질을 장기 보존하기 위해 0℃ 이하의 온도에서의 동결 보존법이 일상적으로 사용되고 있다. 그러나, 이들 물을 함유하는 물질을 동결하면, 동결 중에 물 분자끼리 용질이나 혼입물의 매질을 배제(排除)하면서 결정화하여 물 분자만으로 이루어진 얼음 결정을 형성하므로, 함수물 중에서 용질이나 혼입물의 매질이 불균일하게 확산되어, 동결 농축이 발생하는 것으로 알려져 있다. 이와 같은 동결 농축을 방지하기 위해, 여러 가지 저분자 화합물을 첨가하는 방법이 실시되고 있다. 예를들어, 세포의 동결 보전을 실시하는 경우에 동결 보존 중에 일어나는 세포내의 결정화에 의한 세포로의 악영향을 최소한으로 억제하기 위해 동결 보호제로서 디메틸설폭시드(DMSO)나 글리세롤 등을 첨가하는 방법이 실시되고 있다. 즉, 5~20 %의 디메틸설폭시드, 글리세린, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜 등의 동결 보존제를 포함하는 배양액등의 생리적 용액에 세포를 현탁하여 크라이오 튜브에 채워 냉각하고, 최종적으로 -80 ℃ 또는 -196 ℃의 극저온에서 동결 보존하는 것이 일반적이다.

[0039] 본 발명은, 실용에 적합한 우수한 빙결정화 저해 활성을 갖고, 식품 제조에 이용할 수 있는 안전한 공정으로, 간단하고, 효율 좋고, 저렴하게 제조할 수 있는 빙결정화 저해 물질을 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 본 발명은, 당해 빙결정화 저해 물질의 제조 방법, 당해 빙결정화 저해 물질의 활성 부분인 폴리펩티드, 및 당해 빙결정화 저해 물질 또는 폴리펩티드를 함유하는 빙결정화 저해 조성물, 식품, 생체 시료 보호제 및 화장품을 제공하는 것도 목적으로 한다.

[0040] 동결 보존 시, 녹이는 과정에서 얼음 재결정화는 세포 막을 손상시키고 세포 탈수를 진행시킴으로 인해 세포 및 조직에 손상을 입힌다. 저온 환경에 사는 유기체들은 얼음 재결정화로 인해 더 쉽게 손상을 받을 수 있기 때문에, AFP 또는 AFGP가 발달되었다. AF(G)P는 얼음 표면에 부착되어 얼음이 성장하는 것을 억제하기 때문에, 얼음 재결정화가 문제가 되는 분야에서 첨가제로서 활용되었다. 본 발명에서는 AF(G)P로부터 유래된 펩티드를 이용한 동결 제어용 물질을 개발하였다.

[0041] 본 발명에서 “항동결 단백질”, “항-동결 단백질” 또는 “AFP”는 상호 교환적으로 사용 가능하고, “항동결 당단백질”, “항-동결 당단백질” 또는 “AFGP”는 상호 교환적으로 사용 가능하며, AFP 및 AFGP를 통합하여 “AF(G)P”로 지칭한다. AF(G)P는 다양한 동물, 식물, 곰팡이 및 박테리아에서 발견되며, 이들 단백질은 얼음 결정에 결합함으로써 얼음의 성장 및 재결정화를 억제하는 것으로 알려졌다. 이러한 AF(G)P의 성질은 저온에서 생물학적 시료를 보존하는 데에 이용되어 왔다. 최근의 연구에 따르면, AF(G)P는 해당 유형에 따라 얼음에 결합하기 위한 특수한 형태의 3차 구조를 갖는데, 얼음과 접촉하는 방향에는 Thr이 다수 존재하고, 보조적으로 Ala이 존재하는 것으로 알려졌다.

[0042] 이에 본 발명자는 $(Thr)_5$, 및 $(Thr)_{10}$의 올리고펩티드를 합성하였고, 놀랍게도 이들 올리고펩티드가 자기조립을 통하여 나노구조체를 형성함을 확인하였다. 이로부터 물 또는 얼음 결정과 수소결합 또는 소수성 상호작용을 할 수 있는 잔기를 가지는 올리고펩티드로부터 제조된 나노구조체가 결빙을 제어할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0043] 본 발명의 일 실시예에서는 $(X)_n$으로 표시되는 올리고펩티드를 포함하는 조성물로서, 상기 X는 Ser, Asp, Glu, Cys, Ala, Val, Tyr, 및 Thr으로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 아미노산이고, 상기 n은 1 내지 15의 정수인, 조성물을 제공한다. 상기 X는 물분자와 수소결합을 형성할 수 있는 카르복실기를 지닌, 음전하를 띄는 아미노산 잔기인 Asp, 및 Glu; 물 분자와 수소결합을 형성할 수 있는 티올기를 갖는 Cys; Thr의 $-CH_3$기가 -H로 치환된 Ser; Thr의 -OH기가 $-CH_3$로 치환된 Val; Thr의 -OH기가 H로 치환된 Ala; 또는 Thr의 -OH가 H로 치환되고, CH_3가 페놀기로 치환된 Tyr이 이용될 수 있다. 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 X는 Ala, Val, Tyr, 또는 Thr이다.

[0044] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 n은 1 내지 15의 정수, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 또는 15이다. 본 발명의 다른 실시예에서, 상기 n은 2 내지 14의 정수, 3 내지 13의 정수, 4 내지 12의

정수, 또는 5 내지 10의 정수이다. 본 발명의 또 다른 실시예에서, 상기 n은 5 또는 10이다.

[0045] 또한, 상기의 나노구조체를 물에 투여하는 경우 열적이력현상을 일으키고/거나 얼음 재결정화 현상을 억제시킴을 확인하였으며, 세포를 동결 후 해동할 때 세포의 생존률을 높일 수 있음을 확인하였다. 특히 이러한 현상은 $(Tyr)_5$, 및 $(Tyr)_{10}$의 올리고펩티드에서 뿐만 아니라, 특히 $(Val)_5$, $(Val)_{10}$, $(Ala)_5$, $(Ala)_{10}$, $(Thr)_5$, 및 $(Thr)_{10}$의 올리고펩티드에서 두드러지게 나타났다.

[0046] 본 발명에서 사용하는 용어 "항동결", "항-동결", "동결 제어", "결빙 제어", "동결 억제" 및 "결빙 억제"는 상호 교환적으로 사용 가능하고, 어는점을 낮추거나, 얼음이 형성되지 않도록 하거나 얼음 형성 속도를 늦추거나, 얼음의 재결정화가 되지 않도록 하거나, 얼음 재결정화 속도를 늦추거나, 얼음 결정의 크기를 작게 유지하는 작용을 의미한다.

[0047] "열 이력현상"은 동결 온도와 용융 온도가 상이하게 되는 현상을 의미한다. 물에 핵 형성제가 존재하는 경우, 동결 온도와 용융 온도가 실질적으로 동일하다. 그러나 핵 형성제가 존재하지 않거나 핵 형성제가 항동결 단백질인 경우, 동결 온도가 용융 온도보다 더 낮게 형성된다.

[0048] "얼음 재결정화"는 작은 얼음 결정으로부터 더 큰 얼음 결정으로 성장하는 과정을 의미하고, 오스왈드 숙성(Ostwald ripening)은 상온 및 결정 사이 표면 에너지 차이로 인한 압력에서 발생하는 이러한 재결정화를 의미하며, 융해-확산-재동결 또는 승화-확산-응축 메커니즘으로 진행될 수 있다.

[0049] 본 발명에서 사용하는 용어 "올리고펩티드", "폴리펩티드", "펩티드" 및 "단백질"은 상호교환적으로 사용되고, 펩티드 결합을 통해 공유결합된 아미노산 잔기로 구성된 중합체 화합물을 지칭한다. 본 발명에서는 공지의 기술을 통해 합성된 펩티드를 이용할 수 있다. 펩티드의 합성 방법은, 화학적 방법, 또는 생물학적 방법일 수 있고, 화학적 방법은, 예를 들어, 용액상 방법; tert-butyloxycarbonyl (Boc)/benzyl (Bzl) 전략 및 9-fluorenylmethoxycarbonyl (Fmoc)/tert-butyl (t -Bu) 전략을 포함하는 고체상 방법 (Kent SBH, Mitchell AR, Engelhard M, Merrifield RB (1979) Mechanisms and prevention of trifluoroacetylation in solid-phase peptide synthesis. Proc Natl Acad Sci USA 76(5):2180-2184); 레진에 첫번째 아미노산을 고정화시키고 서열 순서대로 펩티드 사슬을 연장시키는 방법; 또는 마이크로파를 이용한 방법일 수 있고, 생물학적 방법은 미생물을 이용한 방법일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명에 따른 나노구조체는 결빙을 억제하는 특성을 지니고 있으며, 이러한 특성은 세포 및/또는 식품의 동결 보존 시에 이용될 수 있다. 세포나 식품의 동결 및 해동 시, 얼음의 재결정화로 인하여 세포가 파괴되므로, 세포 생존률이 낮아지거나 식품의 식감이 현저하게 떨어지는 문제가 발생한다. 그러나 본 발명의 나노구조체를 세포 및/또는 식품의 동결보존제로서 이용하는 경우에는 얼음의 재결정화를 억제하거나 열이력현상을 유도함으로써 세포가 파괴되는 것을 억제할 수 있게된다. 결과적으로 동결 보존된 세포를 해동하는 경우 종래의 방법에 비하여 세포 생존률이 높아지고, 동결 보존된 식품의 경우 동결 전의 식감을 유지할 수 있게 된다.

[0051] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명에 따른 세포 동결 보존용 조성물을 이용하여 동결 보존할 수 있는 세포는 원핵 세포; 진핵 세포; 미생물; 동물 세포; 암 세포, 정자; 난자; 성체 줄기 세포, 배아 줄기 세포, 역분화 줄기 세포를 포함하는 줄기 세포; 제대혈, 백혈구, 적혈구, 및 혈소판을 포함하는 혈액 세포; 신장 세포, 간 세포, 및 근육 세포를 포함하는 조직 세포일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0052] 본 발명의 일 실시예에서는, 본 발명에 따른 나노 구조체를 용매에 첨가함으로써 결빙을 제어하는 방법, 본 발명에 따른 나노 구조체를 세포를 포함하는 용액에 첨가하는 단계를 포함하여 세포를 동결 보존하는 방법, 및 본 발명에 따른 나노 구조체를 식품에 처리하는 단계를 포함하여 식품을 동결 보존하는 방법을 제공한다.

[0053] 본 명세서에서 수치가 범위로 기재되어 있는 경우, 해당 범위 내에 있는 모든 수치가 본 발명에 개시된 것으로 본다.

[0054] 통상의 기술자는 "약"이 불가피하게 사용되어야 하는 경우를 이해할 것이며, 본 명세서에서 용어 "약"은 오차 범위 내의 수치를 포함하는 것으로 이해될 것이다.

[0055] 본 발명에서 사용하는 용어 "실질적으로 동일"는 오차범위 내에서 동일하거나, 인지할 수 없는 정도의 차이가 있는 경우를 의미한다. 본 발명에서 사용하는 용어 "실질적으로 없다", "실질적으로 없는" 또는 이와 유사한 의미의 표현은, 0 또는 오차 범위 내에 0이 포함되는 경우, 또는 통상의 기술자가 인식하기에 무시할 수 있는 경우를 지칭한다.

[0057] 이하에서는 본 발명을 구체적인 실시예를 들어 설명한다. 하기 실시예는 오직 예시목적으로 의도되며, 어떤한 식이든 본 발명의 범위를 제한하기 위한 것이 아니다.

[0059] **실시예 1.** 알라닌 5개가 연결된 올리고펩티드의 나노구조체

[0060] 알라닌 5개 또는 10개가 연결된 올리고펩티드는 애니젠 주식회사에서 순도 98% 이상으로 합성된 펩티드를 사용하였으며, 펩티드 2 mg을 증류수 100 μL에 넣고, 승온 50도 물중탕 및 소닉 2-3분간을 거쳐 투명한 용액상이 된 것을 확인한 다음 실온에 30분 이상 방치하면 용액이 현탁해지는 것을 관찰할수 있었다. 이 용액을 전자현미경 분석을 위하여 5 μL정도 취하여 전자현미경 분석을 위한 그리드에 올린 다음 실온에서 2시간이상 건조시켰다. Uranyl acetate 용액 (5 μL)를 가하여 염색하고 추가 건조 과정을 거친 다음 전자현미경 분석을 통해 생성된 구조를 확인하였다 (도 1).

[0062] **실시예 2.** 발린 5개가 연결된 올리고펩티드의 나노구조체

[0063] 발린 5개 또는 10개가 연결된 올리고펩티드는 애니젠 주식회사에서 순도 98% 이상으로 합성된 펩티드를 사용하였으며, 펩티드 2 mg을 증류수 100 μL에 넣고, 승온 50도 물중탕 및 소닉 2-3분간을 거쳐 투명한 용액상이 된 것을 확인한 다음 실온에 30분 이상 방치하면 용액이 현탁해지는 것을 관찰할수 있었다. 이 용액을 전자현미경 분석을 위하여 5 μL정도 취하여 전자현미경 분석을 위한 그리드에 올린 다음 실온에서 2시간이상 건조시켰다. Uranyl acetate 용액 (5 μL)를 가하여 염색하고 추가 건조 과정을 거친 다음 전자현미경 분석을 통해 생성된 구조를 확인하였다 (도 2).

[0065] **실시예 3.** 타이로신 5개가 연결된 올리고펩티드의 나노구조체

[0066] 타이로신 5개 또는 10개가 연결된 올리고펩티드는 애니젠 주식회사에서 순도 98% 이상으로 합성된 펩티드를 사용하였으며, 펩티드 2 mg을 증류수 100 μL에 넣고, 승온 50도 물중탕 및 소닉 2-3분간을 거쳐 투명한 용액상이 된 것을 확인한 다음 실온에 30분 이상 방치하면 용액이 현탁해지는 것을 관찰할수 있었다. 이 용액을 전자현미경 분석을 위하여 5 μL정도 취하여 전자현미경 분석을 위한 그리드에 올린 다음 실온에서 2시간이상 건조시켰다. Uranyl acetate 용액 (5 μL)를 가하여 염색하고 추가 건조 과정을 거친 다음 전자현미경 분석을 통해 생성된 구조를 확인하였다 (도 3).

[0068] **실시예 4.** 쓰레오닌 5개가 연결된 올리고펩티드의 나노구조체

[0069] 쓰레오닌 5개 또는 10개가 연결된 올리고펩티드는 애니젠 주식회사에서 순도 98% 이상으로 합성된 펩티드를 사용하였으며, 펩티드 2 mg을 증류수 100 μL에 넣고, 승온 50도 물중탕 및 소닉 2-3분간을 거쳐 투명한 용액상이 된 것을 확인한 다음 실온에 30분 이상 방치하면 용액이 현탁해지는 것을 관찰할수 있었다. 이 용액을 전자현미경 분석을 위하여 5 μL정도 취하여 전자현미경 분석을 위한 그리드에 올린 다음 실온에서 2시간이상 건조시켰다. Uranyl acetate 용액 (5 μL)를 가하여 염색하고 추가 건조 과정을 거친 다음 전자현미경 분석을 통해 생성된 구조를 확인하였다 (도 4).

[0071] **실시예 5. Thermal hysteresis**(TH) activity

[0072] 결빙방지 단백질에 의한 얼음결정 형태의 변화를 관찰하기 위하여 나노리터 삼투압계 (nanoliter osmometer)(Otago osmometers, New Zealand)를 사용하였다. 샘플 챔버 내에 immersion oil을 채운 후 측정 시료를 오일 위에 올려 두었다. 샘플 챔버를 스테이지에 올려놓 고 -20℃로 급속 냉동시키고 온도들 천천히 상승시켰다. 얼음 결정이 대부분 녹고 관찰 대상 결정만을 남겼다. 다시 스테이지의 온도를 천천히 내리면서 얼음 결정이 형성되는 것을 관찰하였다. 온도가 하강해도 얼음 결정이 커지지 않고 유지하다가 급격히 결정이 성장하는 온도를 (어는점, freezing temperature) 측정하였다 (Kuiper et al., 2003).

표 1

	Negative control (증류수)	Alanine 5	Valine 5	Tyrosine 5	Threonine 5
Thermal hysterisis	0.00	0.246	0.288	0.215	0.208
어는점 (℃)	0.00	-2.1	-3.1	-2.0	-2.1

[0073]

[0074] 그 결과, 표 1에 기재된 바와 같이, 본 발명에 따른 올리고펩티드로 형성된 나노구조체는 물의 어는점을 낮추는 것을 확인할 수 있었다.

[0076] **실시예 6. RI activity**

[0077] RI activity (Recrystallization inhibition activity)는 Olympus BX51 uplight microscope와 연결된 Linkam TMHS600 cold stage (Linkam scientific instruments, Surrey, UK)을 이용하여 수크로오스를 이용하는 Smallwood 방법을 시행하였다. 30%의 수크로오스에 2㎕의 시료를 넣은 후 두 유리커버 사이에 놓았다. 온도는 90℃의 속도로 -80℃까지 내린 후 1분 동안 유지하였다. 그리고 -6℃로 조정하고 60분 동안 유지하였다.

[0078] 그 결과, 도 5에 개시된 바와 같이 증류수에서의 단일 얼음 결정 성장과 올리고펩티드 자기조립 물질이 포함된 수용액에서의 얼음 결정 성장 형태는 완전히 상이하며, 아미노산의 종류에 따라서 얼음 결정의 성장 모습이 확연하게 다름을 확인하였다 (도5). 이는 본 발명에 따른 나노구조체가 얼음의 재결정화를 억제시키는 활성이 있음을 나타내는 것이다.

[0080] **실시예 7. 세포동결보존실험**

[0081] HUVEC cells subculture를 통해 $5x10^4$개 세포 이상 확보 (n=1 : $1x\ 10^4$개 세포), Freezing solution [FBS(9 ml)+DMSO(1 ml)]을 제조하였다. 1 ml를 취한 후 $1x10^4$개 pellet 상태로 있는 세포에 첨가하였다(in falcon tube). 세포가 들어 있는 Freezing solution 1ml를 vial에 옮긴 후 Freezing container에 넣었다(1 vial 당 [1x10^5개/Freezing solution 1 ml] 총 5개). Container를 통해 vial 의 온도를 급속 냉동고 (deepfreezer)에서 -1℃/min 속도로 -80℃까지 냉각시키고, 1 day 후 액체 질소통으로 옮겨 보관하였으며, 일정기간(1일, 3일, 10일)이 지난 후 해동 시 37℃의 온수조에서 2 mins동안 Freezing solution 녹인 후 1000 rpm으로 5 mins간 원심분리하여 세포를 수거한 후, 세포 수에 맞는 적당한 Dish에 seeding 하였다: 1) stock vial를 water bath에 2분간 녹였다. 2) 세포가 들어있는 freezing solution를 15 ml tube에 옮기고 9 ml media와 섞어주었다. 3) 1000 rpm으로 5분간 원심분리 후 상층액을 제거하므로써 Freezing solution 제거해주었다. 4) cell pellet에 fresh media를 넣고 cell count 후 dish에 seeding였다.

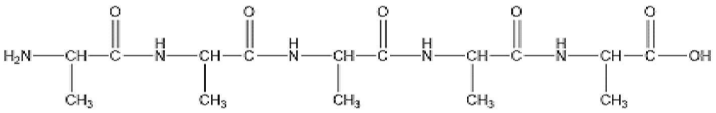
[0082] MTS를 통해 cell viability 측정하였으며, one solution MTS 용액으로 교체하여 cell viability를 측정하였으며, 그 결과는 도 6 및 도 7에 도시하였다.

[0083] 5개의 알라닌, 발린, 타이로신, 또는 쓰레오닌으로 구성된 올리고펩티드의 나노구조체 및 10개의 알라닌, 발린, 타이로신, 또는 쓰레오닌으로 구성된 올리고펩티드의 나노구조체는 모두 음성 대조군 (결빙 억제제를 투여하지 않은 군)에 비하여 현저하게 높은 결빙 억제 효능이 나타남을 확인 하였다. 또한, 결빙 억제 효능이 잘 알려진 DMSO 처리군과 비교할 때에도 타이로신으로 제조된 나노구조체를 제외한 모든 군에서 유의적으로 세포 생존률이 높게 나타남을 확인하였다. 타이로신으로 구성된 나노구조체의 경우, 비록 DMSO에 비하여 낮은 세포 생존률을 나타내었으나, 본 발명의 나노구조체는 세포 독성이 실질적으로 없거나, DMSO에 비하여 현저히 낮다는 점을 고려할 때, 세포, 조직, 또는 장기의 동결건조 시 유용하게 활용될 수 있음을 시사한다.

도면

도면1

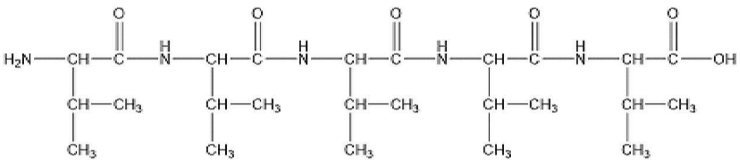
5개의 알라닌이 연결된 구조

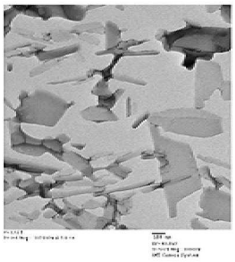




도면2

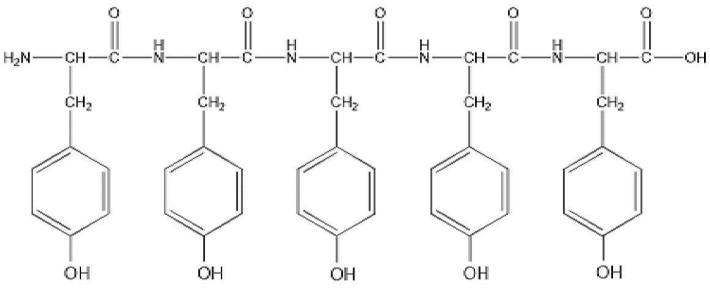
5개의 발닌이 연결된 구조

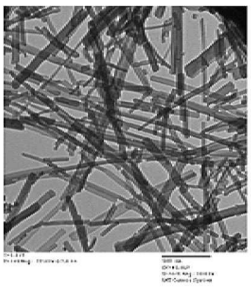




도면3

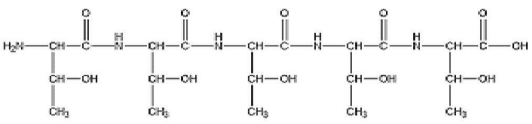
5개의 타이로신이 연결된 구조

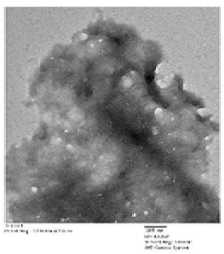


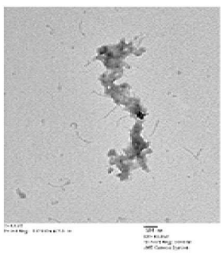


도면4

5개의 쓰레오닌이 연결된 구조

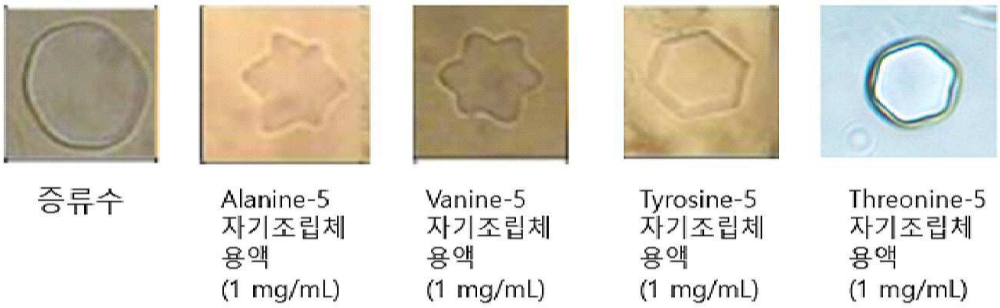




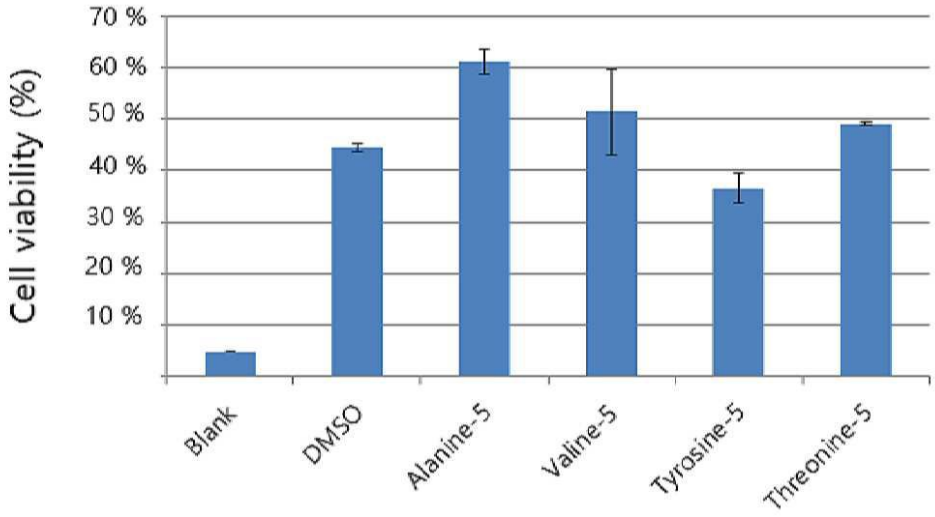


도면5

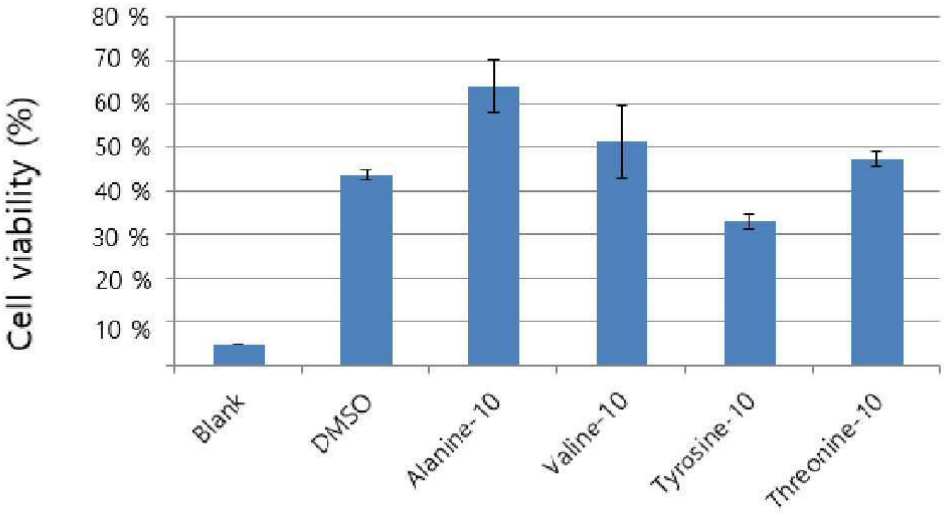
얼음 결정의 성장 형태



도면6



도면7


Cell viability (%)
80 %
70 %
60 %
50 %
40 %
30 %
20 %
10 %
Blank
DMSO
Alanine-10
Valine-10
Tyrosine-10
Threonine-10